

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-35968

(43)公開日 平成8年(1996)2月6日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/576		Z		
A 6 1 K 39/395		D		
G 0 1 N 33/53		V		

審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 11 頁)

(21)出願番号	特願平6-192105	(71)出願人	000005968 三菱化学株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22)出願日	平成6年(1994)7月22日	(72)発明者	大工原 恭 鹿児島県鹿児島市明和4丁目14-10-41
		(72)発明者	新垣 尚捷 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘4丁目6-6
		(72)発明者	石井 健久 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三 菱化成株式会社総合研究所内
		(72)発明者	佐藤 真紀 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三 菱化成株式会社総合研究所内
		(74)代理人	弁理士 長谷川 曉司

(54)【発明の名称】 肝疾患の診断方法

(57)【要約】

【構成】 ヒト体液中に含まれる不活性型の1本鎖ヒト肝実質細胞増殖因子を検出することにより、急性肝炎、劇症肝炎、慢性肝炎および肝硬変等の肝疾患を診断する。

【効果】 本発明によれば、現在の診断系よりも病態をよく反映した肝疾患の診断系を提供することができる。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト体液中に含まれる不活性型の1本鎖ヒト肝実質細胞増殖因子を検出することを特徴とする肝疾患の診断方法。

【請求項2】 活性型の2本鎖ヒト肝実質細胞増殖因子に対する抗体を用いることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 活性型の2本鎖ヒト肝実質細胞増殖因子および不活性型の1本鎖ヒト肝実質細胞増殖因子に対して共に反応性を有する抗体を用いることを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 肝疾患が、急性肝炎、劇症肝炎、慢性肝炎および肝硬変から選ばれることを特徴とする請求項1～3に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は肝疾患の診断方法に関し、詳細にはヒト肝実質細胞増殖因子（以下、「hHGF」と略記する）に対する特定の抗体を用いることによる肝疾患の診断方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】肝炎や肝硬変等に代表される肝疾患は、肝臓癌へと進行し、死に至ることがある重篤な疾患である。ところが肝臓は生体内の中でも極めて複雑な臓器であり、その機能が十分に解明されていないため、肝疾患障害に対する有望な薬剤はいまだに見出されていない。

【0003】近年、インターフェロンの肝疾患、特に肝炎に対する効果が報告されている。しかしインターフェロンは全ての肝炎患者に対して効果を有するわけではなく、またその多用による副作用が問題視されている。肝疾患の診断系においても、肝炎の原因と考えられているウイルスのゲノム構造が解明されたことに伴い、かかるウイルスの遺伝子がコードするポリペプチド等を使用したアッセイ系が開発されているが、ウイルスが極めて変異しやすい等の理由により、十分な検出感度は得られていないのが現状である。

【0004】一方、ヒト肝実質細胞増殖因子（以下、「hHGF」と略記する。また単に肝実質細胞増殖因子を表す場合、「HGF」と略記する）は、生体内より取り出した初代培養肝実質細胞の増殖を促進せしめるヒト由来の蛋白性因子で、劇症肝炎患者血漿より見出された（特開昭63-22526号公報）。さらにその後、hHGF蛋白質をコードするアミノ酸配列および遺伝子（cDNA）配列（特開平3-72883号公報）、さらにこのcDNAを用いることによる組換えhHGF蛋白質の生産方法（特開平3-285693号公報）についても報告されている。かかる組換えヒトHGF（以下、「rhHGF」と略記する）蛋白質は、生体外（J. Clin. Invest., 87, 1853-1

2

857（1991））、また生体内（Jpn. J. Pharmacol., 59（suppl. 1）, 137（1992））において肝実質細胞の増殖および機能を促進する働きが認められた。さらに、hHGFの標的細胞・組織が広く検索され、肝細胞以外の種々の上皮細胞（尿細管上皮・肺上皮・胆管上皮・胃上皮）や線維芽細胞・リンパ球系細胞がHGFに反応してその増殖や運動性を変化させることが判明した（Mitsubishi Kasei R&D Review, 7, 16-24（1993））。また、これらHGF標的細胞上のレセプター分子として、癌原遺伝子c-met産物が機能していることも明らかとなっている（Science, 251, 802-804（1991））。

【0005】hHGFは、分子量約86,000のヘテロダイマー構造を有する糖蛋白質であるが、もともとは1本鎖の前駆体蛋白質としてmRNAより合成され、次いでジスルフィド結合を介した活性型の2本鎖蛋白質にプロセスされることが判明している（Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 967-973（1989））。また、このプロセスの過程に着目し、1本鎖前駆体から2本鎖成熟体にプロセスされて初めてHGFとしての活性が獲得されること（J. Biol. Chem., 267, 20114-20119（1992））、およびこのプロセス化に新規なセリンプロテアーゼ（以下、「HGFアクチベーター」と略記する）が関与することも知られている（J. Biol. Chem., 268, 10024-10028（1993））。また、実験動物を用いた解析から、HGFは種々の肝障害及び肝切除に伴ってその合成が促進されること（FEBS Lett., 270, 81-84（1990））、さらにHGFが正常肝中にも潜在型として存在しており、肝障害に伴ってHGFアクチベーターが活性化されてHGFを2本鎖型にプロセスすること（J. Biol. Chem., 269, 8966-8970（1994））が明らかとなっている。ラットにおいては、HGFと各種臓器障害との関連において、肝障害のみならず腎障害（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 4357-4361（1994））および肺障害（J. Biol. Chem., 268, 21212-21217（1993））の再生過程へのHGF関与が示唆されている。ヒトにおいても、HGF測定系が開発され（Hepatology, 13, 1-5（1991））、種々の肝疾患及びその他の疾患における生体内HGF濃度が測定されている。それによると、血中HGF量は種々の肝疾患において上昇することが認められ、HGFの診断意義として、劇症肝炎早期診断、肝不全の早期予知、肝障害程度の推定などが示唆された。さらに、最近、妊娠中毒症や腎疾患で血中HGF高値が、リウマチで滑液・骨髓液中HGF高値が、各種白血病で骨髓液中HGF高値が認められ、それ

3

ら疾患におけるHGF診断意義も議論されている(第1回HGF/SF研究会、1994抄録)。しかしながら、従来の技術においては、体内HGF値は抗HGF抗体と反応するHGFの総和を見ているにすぎず、各種ヒト疾患において増加する体内HGFが、2本鎖成熟体HGFであるのか1本鎖前駆体HGFであるのかは明らかではなかった。また、ヒト体内においてもラット同様に1本鎖HGF前駆体が存在しており、それがヒト疾患において変動するものであるかは不明であった。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、肝疾患の新しい診断法を提供するべく検討を重ねてきた結果、1本鎖HGF前駆体が健康人血漿中には存在せず、劇症肝炎・慢性肝炎・肝硬変等の肝疾患患者血漿中にのみ存在することを初めて見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち本発明の要旨は、ヒト体液中に含まれる不活性型の1本鎖ヒト肝実質細胞増殖因子を検出することを特徴とする肝疾患の診断方法に存する。以下、本発明につき詳細に説明する。1本鎖のHGFは、前述したように活性型である2本鎖HGFの前駆体である。従って1本鎖のHGFを検出する手段としては、

- ① 1本鎖のHGFのみを特異的に検出する
  - ② 1本鎖のHGFおよび2本鎖のHGFの総和を検出し、そこから2本鎖のHGF量を差し引く
- 等が具体的な方法として挙げることができる。いずれにしても、本発明においては1本鎖のHGFおよび/または2本鎖のHGFに対する抗体を使用することが望ましい。抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれもが使用できる。これらの抗体は、いずれも常法に従って調製することができる。例えばモノクローナル抗体は、特公平5-60359号公報に記載の方法に従って、容易に作製することができる。

【0008】抗体は、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ等の酵素を用いて標識することにより、エンザイム・イムノアッセイに供することができる。本発明においては、ヒト由来の体液、例えば血液、血漿、血清、リンパ液、汗、尿等に含まれる1本鎖のHGFを、上記抗体を用いて検出する。1本鎖のHGFは、後述の実施例に示すように、健康人には存在せず、急性肝炎、劇症肝炎、慢性肝炎、肝硬変等の肝疾患患者内においてのみ存在する。従って1本鎖のHGFを検出することは上記肝疾患の早期発見につながるものであり、臨床上の意義は極めて大きいものである。

【0009】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、その要旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。

実施例1 劇症肝炎患者血漿中の1本鎖および2本鎖HGFの検出

特開平5-208998号公報に記載の方法に従って、

4

組換えヒト1本鎖HGF前駆体を調製した。すなわちチャイニーズハムスター卵巣由来細胞株CHOにヒトHGF cDNA発現ベクターを導入し、安定してhHGFを生産する産生株を作製した。hHGF産生株を無血清eRDF培地(極東製薬社)中でローラーボトルで培養し、0.2μmフィルター(アモコン社)通過後の培養上清をSP-セファロース・ファースト・フロー(F)(ファルマシア社)カラムにアプライした。0.3Mから1MのNaClにてグラジエント溶出し、組換えhHGF標品を得た。本条件では10%程度の2本鎖HGFを含み、1本鎖、2本鎖HGFとも約0.7M NaClにて溶出された。

10

【0010】一方、健康人5名、劇症肝炎患者2名(昏睡グレードII)、慢性肝炎患者2名および肝硬変患者2名より血清を採取した。劇症肝炎患者2名からは、血漿交換時に血漿を採取した。血漿及び血清サンプルは使用まで-70℃にて保存した。次に、健康人血清由来のHGFアクチベーターを部分精製した。約50mlの健康人血清を20mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)にてSP-セファロースFFカラムにアプライし、次いで素通り画分をヘパリン-セファロース(ファルマシア社)カラムにアプライして、0.1-1M NaClにてグラジエント溶出した。活性画分をさらにヒドロキシアパタイト(ファルマシア社)カラムに載せ、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)にて溶出した。各画分の活性は以下のように確認した。すなわち、各画分100μlと劇症肝炎患者由来血漿サンプル100μlを37℃、2時間反応させ、サンプル中のHGF量をELISAにて測定し、サンプル中HGF量を増大させる画分をHGFアクチベーター画分とした。

20

30

【0011】上記劇症肝炎患者由来の血漿サンプル200μlを、ウサギ抗組換えhHGF(以下、「rhHGF」と略記する)ポリクローナル抗体10μgと4℃にて20時間、次いで10μlのプロテインAセファロースを加えて4℃にて3時間インキュベートし、免疫複合体を形成させた。これを0.5%NP-40を含む20mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)にて十分に洗浄後、20μlのSDS-サンプル緩衝液(Nature, 227, 680-685(1970))中で5分間ボイルした。サンプルを還元および非還元条件にてドデシル硫酸ナトリウム(SDS)-5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)法にて分離し(20mA一定)、次いで泳動ゲルを水平型ブロッティング装置(ザルトリウス社)にセットして150mA一定、1時間にてナイロン膜(ミリポア社)上に泳動蛋白質をブロットした。ナイロン膜上のHGF蛋白質は、アビジン/ビオチン結合を利用したウエスタンブロッティング法により検出した。すなわち、膜を5%スキムミルクにてブロッティング後、まずウサギ抗hHGFポリクローナル抗体またはマウス抗hHGFモノクローナル抗体(10μ

40

50

5

g/ml)で37℃、2時間、次いで抗ウサギまたはマウスIgGビオチン化抗体で37℃、1時間、さらにストレプトアビジン溶液で、室温、約15分反応させて、膜上hHGF蛋白質を検出した(ベクター社、ELITEキット)。

【0012】図1AおよびBに結果を示す。図1Aは、CHOトランスフェクタント培養上清より精製したrhHGF 1本鎖前駆体(2μg/lane)を還元下でSDS-PAGEで分離し、ウエスタンブロッティングの後に、ナイロン膜上のrhHGF蛋白質をマウス抗hHGFモノクローナル抗体(lane 1)、またはウサギ抗rhHGFポリクローナル抗体(lane 2)と反応させてELITEキットで発色させたものである。約90KダルトンのHGF 1本鎖前駆体は、lane 2でのみ検出されている。図1Bは、劇症肝炎患者由来血漿(lane 1および4)、健常人血漿(lane 2および5)、または健常人由来HGFアクチベーター画分と前処理した劇症肝炎患者由来血漿(lane 3および6)からHGF蛋白質を免疫沈降させ、非還元(lane 1-3)または還元(lane 4-6)条件にてSDS-PAGEで分離し、さらにマウス抗hHGFモノクローナル抗体(lane 1-3)またはウサギ抗rhHGFポリクローナル抗体(lane 4-6)を用いたウエスタンブロッティングにてHGF蛋白質を検出したものである。非還元下において、劇症肝炎由来血漿中には2本鎖HGFが検出される(lane 1)が、その量は血漿サンプルをHGFアクチベーター画分と前処理することにより2倍以上に増大した(lane 3)。還元下では、1本鎖HGF前駆体が劇症肝炎由来血漿中に見出され(lane 4)、その量はHGFアクチベーターとの前処理により著明に減少した(lane 6)。また、健常人血漿中には1本鎖、2本鎖いずれの型のHGFも検出できなかった。

【0013】以上の結果から、1本鎖HGF前駆体はこ\*

表1

6

\*のウエスタンブロッティングの系においては、マウス抗hHGFモノクローナル抗体で検出されず、ウサギ抗rhHGFポリクローナル抗体で検出されること、劇症肝炎患者血漿中には、2本鎖HGFに加えて1本鎖HGF前駆体が存在していること、そして1本鎖HGFも2本鎖HGF同様健常人血漿中には認められないことが判明した。

【0014】実施例2 劇症肝炎患者由来血漿サンプル中HGF量の測定

劇症肝炎患者の血漿サンプル100μlに健常人血清等を添加して、37℃にて0-2時間インキュベートし、反応液の50μlをELISAによるHGF定量に供した。対照群として血清の代わりに0.5%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝液/生理食塩水(PBS)を同量添加した。また、血清中HGFアクチベーターを不活化する目的で血清とともにロイペプチン50μMを添加する検討も行った。

【0015】大塚製薬社製、hHGFアッセイキットにより定量した。すなわち、96穴アッセイプレートの各ウェルに希釈緩衝液50μl及びhHGF標準液または検体50μlを加え、室温にて攪はんしながら1時間反応させた。洗浄液にて3回洗浄後、第一抗体溶液(マウス抗hHGFモノクローナル抗体)100μlを加え、室温にて攪はんしながら1時間反応させた。次に洗浄液にて3回洗浄後、第二抗体液(ウサギ抗hHGFポリクローナル抗体)100μlを加え、室温にて攪はんしながらさらに1時間反応させた。洗浄液にて3回洗浄後、発色液を100μl/ウェル加えて室温で約10分間反応させ、適度な発色が見られた段階で反応停止液を100μl/ウェル重層し、各ウェルの吸光度を492nmで測定した。サンプル中HGF濃度は、hHGF標準曲線より算出した。表1に結果を示す。

【0016】

【表1】

	HGF 濃度 (ng/ml)		
	ブレインキュベーション時間		
	0	30分	120分
正常人血清+PBS	<0.1	<0.1	<0.1
患者血漿 + PBS	6.38±0.16	7.12±0.20	8.72±0.35
患者血漿 + PBS +ロイペプチン	—	—	6.45±0.13
患者血漿 + 正常人血清	<6.39	11.96±1.01	15.43±0.70
患者血漿 + 正常人血清 +ロイペプチン	—	—	8.06±0.55

【0017】表1において、劇症肝炎由来血漿中のEL\*50\*ISAにて測定されるHGF量は、血清とのブレインキ

キュベーションにより増大し、2時間後には約2.4倍になった。しかしながら、ロイペプチン添加サンプルでは、この増加は認められず、健常人血漿中にもプレインキュベーション前後でHGFは認められなかった。次

表2

	粗精製HGF アクチベーター	HGF濃度 (ng/ml)
患者血漿	—	8.18±0.24
患者血漿	+	16.38±0.47
患者血漿+ロイペプチン	+	8.57±0.33
組換え1本鎖HGF前駆体	—	2.40±0.23
組換え1本鎖HGF前駆体	+	7.96±0.30
組換え1本鎖HGF前駆体 +ロイペプチン	+	3.22±0.42

【0019】正常人血清の代わりに粗精製HGFアクチベーターを用いても、同様の結果が得られた。すなわち、劇症肝炎患者血漿中HGF値はHGFアクチベーターとのプレインキュベーションで約2倍に増加した。さらに、組換え1本鎖HGF前駆体のELISAによるHGF値も、HGFアクチベーターとのプレインキュベーションで約3.3倍に増加した。以上の結果から、患者血漿中には、2本鎖のみならず1本鎖HGF前駆体が存在しており、健常人血清中のHGFアクチベーターによってプロセスされること、およびプロセス化によって潜在していた1本鎖HGFがELISAに反応するようになってHGF測定値が数倍に上昇することが明かとなつ※

表3

	プレインキュベーション	ロイペプチン	HGF濃度 (ng/ml)
劇症肝炎患者A	—	—	5.59±0.47
	+	—	9.01±0.34
	+	+	7.43±0.35
劇症肝炎患者B	—	—	7.43±0.35
	+	—	9.62±0.31
	+	+	7.93±0.30
慢性肝炎患者A	—	—	0.51±0.03
	+	—	0.67±0.07
	+	+	0.51±0.02
慢性肝炎患者B	—	—	0.45±0.04
	+	—	0.68±0.06
	+	+	0.33±0.02
肝硬変患者A	—	—	0.46±0.03
	+	—	0.31±0.05
	+	+	0.47±0.06
肝硬変患者B	—	—	0.31±0.01
	+	—	0.31±0.01
	+	+	0.31±0.01

※に、正常人血清の代わりにHGFアクチベーターを用いて同様の試験を行った。結果を表2に示す。

【0018】

【表2】

※た。

【0020】実施例3 肝疾患患者由来血漿サンプルと各種血清との前処理によるサンプル中HGF量の変動  
実施例1に示す如く採取した劇症肝炎、慢性肝炎、および肝硬変由来血清を直接、または37℃で2時間プレインキュベートした後にHGF測定用ELISAに供した。その際、一部のサンプルには50μMロイペプチンを添加して、血清中のHGFアクチベーターの作用を抑える処置を施した。表3に結果を示す。

【0021】

【表3】

【0022】血清サンプルのプレインキュベーションにより、サンプル中HGF値は劇症肝炎、慢性肝炎、肝硬変由来のいずれにおいても1.3-1.6倍上昇した。実施例1および2で述べたように、この測定値の上昇は、サンプル中に1本鎖HGF前駆体が存在しており、それがHGFアクトベーターでプロセスされることによって初めてELISA抗原として認識されることに起因する。実際、HGFアクトベーター活性を阻害するロイペプチン存在下では、HGF値の上昇は認められなかった。

【0023】以上の結果より、劇症肝炎のみならず、慢性肝炎、肝硬変など種々の肝疾患においても1本鎖HGF前駆体の存在すること、および患者自身の血清中にもHGFアクトベーターが存在することが判明した。患者血中においては、HGFアクトベーターは部分的にしか活性化されていない為に、血中のHGFの一部は1本鎖前駆体として存在すると解釈される。

実施例4 1本鎖HGF前駆体を測定可能なELISA法

実施例1にて用いたhHGFアッセイキットは1本鎖HGF前駆体を測定できず、それは一次抗体の反応性に起因した。そこで、他の抗体、ウサギ抗rhHGFポリクローナル抗体およびマウス抗rhHGFモノクローナル抗体を調製してELISAを確立し、1本鎖HGF前駆体および2本鎖成熟型HGFに対する反応性を検討した。

【0024】まずウサギ抗HGFポリクローナル抗体を調製した。ニュージーランドホワイトラビット雌10週齢に、特開平3-285693号公報に記載の方法で精製したrhHGF 5mgをフロイント完全アジュバント（1:1）とよく混合して背部皮内投与した（0週）。次いで、10週後にrhHGF約1.5mgをフロイント不完全アジュバント（1:1）とよく混合して脾臓内に直接投与した。13週後にrhHGF 150μgを300μlの0.5M NaCl-0.01%ツウィーン20に溶解して耳静脈より投与した。16週目にはオクタロニー法にて>128倍の力価が認められたため、耳動脈より採血し血清を得た。

【0025】次に、マウス抗HGFモノクローナル抗体を調製した。BALB/cマウス雄8週齢に、rhHGF 30μgをフロイント完全アジュバント（1:1）とよく混合して腹腔内投与した（0週）。次いで、2および4週後にrhHGF 30μgをフロイント不完全アジュバント（1:1）とよく混合して腹腔内投与した。さらに、6週後、rhHGF 45μgをPBSに溶解して尾静脈より投与した。最終免疫の2日後に脾臓を摘出して、マウスミエローマ細胞株P3U1と融合させ、目的の抗体を安定して生産するハイブリドマを樹立した。この細胞株を培養し、培養上清を取得して抗体ソースとした。

【0026】ウサギ抗rhHGFポリクローナル抗体を含有する血清はPBSにて10倍に希釈し、またマウス抗rhHGFモノクローナル抗体を産生するハイブリドマの培養上清は40%硫酸沈澱析出物を100mM NaCl-10mM トリス（pH9）に溶解して、プロテインA-セファロースカラムクロマトグラフィーに供した。サンプルを添加したカラムはPBS（血清サンプル）または100mM NaCl-10mM トリス（pH9）でよく洗浄後、10mMグリシン-HCl

10（pH2.8）にて目的抗体を溶出した。得られた抗体含有液はPBSにて透析、分注し、使用まで-80℃にて保管した。

【0027】得られた抗体のうち、ウサギポリクローナル抗体の一部は2ステップELISA法の二次抗体として用いるため、過よう素酸法によって西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP、ベーリンガーマンハイム社）で標識した。すなわち、HRP 5mg含有0.3M重炭酸ソーダ緩衝液（pH8.3）1mlに1% 1-フルオロ2,4-ジニトロベンゼンエタノール液を0.1ml添加し、室温にて1時間攪はん後、0.06M過よう素酸ナトリウム水溶液1mlを徐々に添加して室温にて30分間攪はん、さらに0.16Mエチレングリコール水溶液1mlを急速に加えて1時間攪はんした。これを10mM炭酸ソーダ緩衝液pH9.6に対して4℃、1昼夜透析して酸化HRPを調製した。精製抗体5mgも同様に10mM炭酸ソーダ緩衝液pH9.6に対して透析しておき、酸化HRP液と抗体液を混合し、室温にて2時間攪はんした。混合液に水酸化ほう素ナトリウム5mgを添加し、4℃で2時間放置後、PBSに対して透析し、HRP標識抗体を得た。結合しなかった抗体およびHRPはセファクリルS-300を用いたゲルろ過によって除去された。すなわち、予めPBSにて平衡化した底面積約3cm<sup>2</sup>、ゲル高約1mのカラムに透析物をアプライし、流速0.2-0.5ml/分程度でPBSにて溶出させた。OD<sub>280</sub>にてモニターしながら最初のピークを分取し、標識抗体画分とした。標識抗体は、小分けして-80℃にて保存した。

【0028】前述した方法で組換えヒト1本鎖HGF前駆体および2本鎖成熟型HGFを取得した。それぞれの蛋白量はOD<sub>280</sub>の値から換算し、一定量を還元下にてSDS-PAGE（12.5%ポリアクリルアミド）に供した。図2にSDS-PAGEの結果を示す。レーン2から4は1本鎖HGF前駆体の、レーン5から7は2本鎖成熟型HGFの電気泳動パターンを示す。1本鎖HGF前駆体画分は少量の2本鎖HGFを含むため、図2のゲルをデンストメーター（島津製作所社）で解析して、バンドの面積から1本鎖/2本鎖の割合を求めた。図中、レーン1-6はそれぞれ、分子量マーカー、1本鎖HGF 2.5μg/レーン、1本鎖HGF 5.0μg/レーン、1本鎖HGF 10.0μg/レーン、

2本鎖HGF 4.3 $\mu$ g/レーン、2本鎖HGF 8.6 $\mu$ g/レーン、2本鎖HGF 17.0 $\mu$ g/レーンを表す。

【0029】図3に結果を示す。それによると、2本鎖成熟型HGFサンプルは、ほぼ100%2本鎖で、1本鎖HGF前駆体を含まなかった(図3A)。一方、1本鎖HGF前駆体サンプルは、約72%の1本鎖型に28%の2本鎖成熟型HGFを含んでいた(図3B)。次に、これらのサンプルをELISAに供して、1本鎖HGF前駆体および2本鎖成熟型HGFの反応性を検討した。

【0030】上記の如く調製した抗HGF抗体を用いて、HGFに特異的なELISA法を確立した。すなわち、ファルコン社96穴プレートに一次抗体としてマウス抗rhHGFモノクローナル抗体またはウサギ抗rhHGFポリクローナル抗体(10 $\mu$ g/mlとなるよう0.05M炭酸緩衝液pH9.6に懸濁)を50 $\mu$ l/ウェル添加して4℃、1昼夜静置、次いで液を捨て、1%ウシ血清アルブミン含有PBSを250 $\mu$ l/ウェル加えて4℃、1昼夜以上置いてウェル壁をブロッキングした。試験時にプレートのブロッキング液を捨ててよく水気を切り、被検液を50 $\mu$ l/ウェル加えた。被検液は0.1%CHAPS、1M(ウサギポリクローナル抗体)または0.4M(マウスモノクローナル抗体)NaCl、0.1%ウシ血清アルブミン、および0.05%ツウィーン20を含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.4)にて適当に希釈した。4℃、1昼夜反応後に液を捨て、0.05%ツウィーン20含有PBS(以下、「PBST」と略記する)にてよく洗浄後、二次抗体としてHRP標識ウサギ抗rhHGF抗体液を50 $\mu$ l/ウェル添加して室温にて2時間反応させた。二次抗体は、上記方法にて調製したものを0.1%ウシ血清アルブミン含有PBSTにて100-200倍に希釈して使用した。2時間後、プレートをPBSTにてよく洗浄して水気を切り、50 $\mu$ l/ウェルの発色液を添加した。発色液は、0.4mg/mlオルソフェニレンジアミンおよび0.01%過酸化水素水を含む0.05Mクエン酸-リン酸緩衝液(pH5.0)から成る。室温で10-20分程度反応させ、適度な発色が得られた時点で4.5N硫酸50 $\mu$ l/ウェルを添加して反応を停止させた。各ウェルの吸光度は二波長測定用イムノリーダー(日本インターメッド社)にて測定(490/620nm)した。

m)した。

【0031】図4および5に結果を示す。図4は、一次抗体としてウサギ抗rhHGFポリクローナル抗体をプレートに固相化した場合(図中□は2本鎖成熟型HGFを、◆は1本鎖HGF前駆体を表す)、図5はマウス抗rhHGFモノクローナル抗体3種を固相化した場合の1本鎖(図中、◆で表す)および2本鎖HGF(図中●で表す)の反応性を示している。横軸は添加HGF濃度を、縦軸はELISA反応性を490nm吸光度で表している。ポリクローナル抗体、3種のモノクローナル抗体いずれの場合においても、2本鎖成熟型HGFとはほぼ同等に1本鎖HGF前駆体とも反応した。

【0032】以上の結果より、HGFのサンドイッチELISA法において、固相化する一次抗体の性質を吟味することにより、2本鎖成熟型HGFと同等に1本鎖HGF前駆体も測定し得るELISAが確立できることが判明した。

#### 【0033】

【発明の効果】本発明によれば、1本鎖HGF前駆体を検出することにより、現在の診断系よりも病態をよく反映した肝疾患の診断系を提供することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】図1Aは、組換えヒトHGF前駆体蛋白質に対するマウス抗ヒトHGFモノクローナル抗体およびウサギ抗ヒトHGFポリクローナル抗体の反応性の相違を、ウェスタンブロッティングにて比較した図面に代わる電気泳動写真である。図1Bは、劇症肝炎由来血漿中に、1本鎖HGF前駆体の存在を認めた図面に代わる電気泳動写真である。

【図2】1本鎖HGF前駆体および2本鎖成熟型HGFのSDS-PAGEの電気泳動パターンを示した図面に代わる写真である。

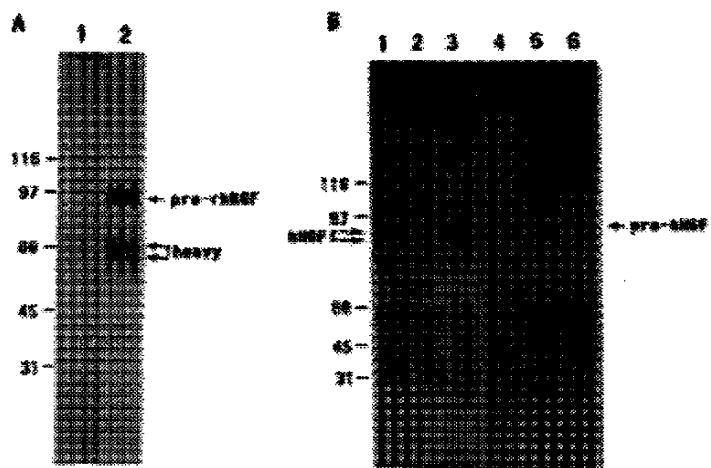
【図3】図2の電気泳動ゲルをデンストメーターにて解析し、1本鎖HGFと2本鎖HGFの割合を定量化した図面である。

【図4】HGF特異的サンドイッチELISA法における1本鎖HGF前駆体および2本鎖成熟型HGFの反応性を示す図面である。

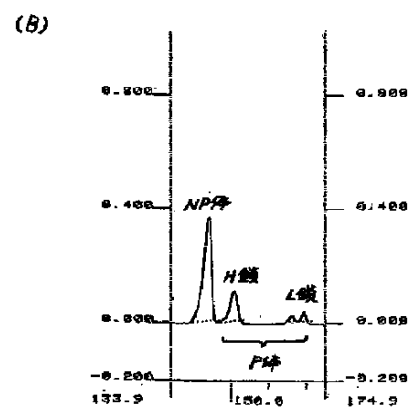
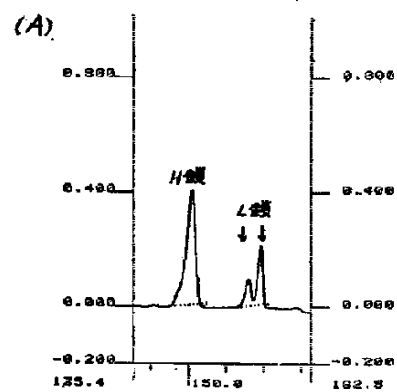
【図5】HGF特異的サンドイッチELISA法における1本鎖HGF前駆体および2本鎖成熟型HGFの反応性を示す図面である。

【図1】

図面代用写真(カラー)



【図3】



カラー写真

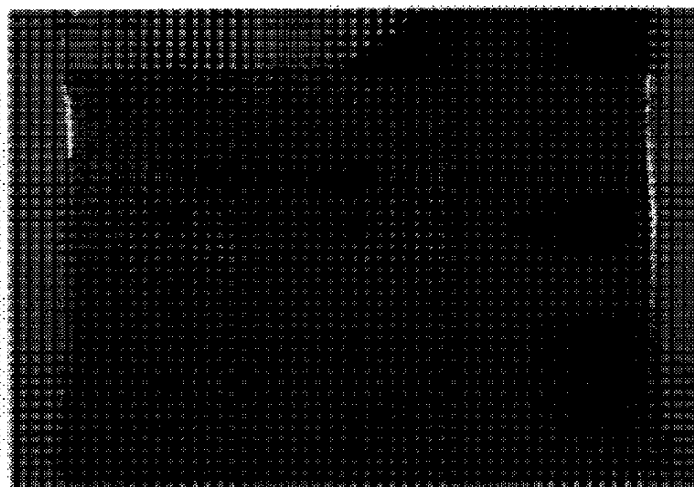


【図2】

図面代用写真

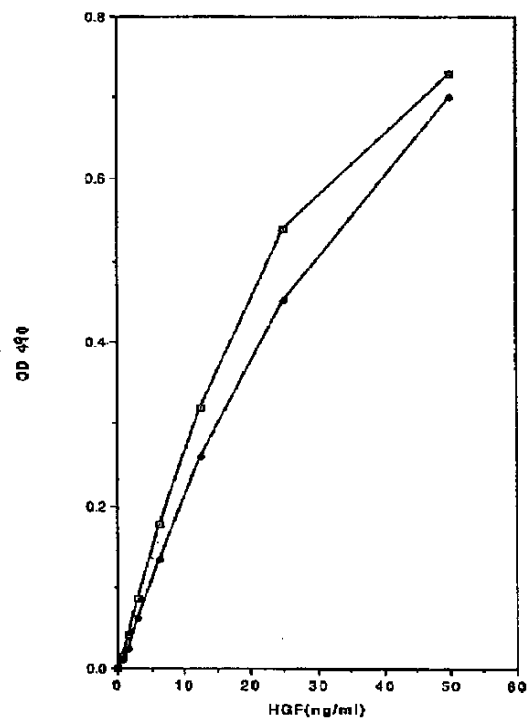
1 2 3 4 5 6 7

KD  
94 →  
67 →  
43 →  
30 →  
20 →

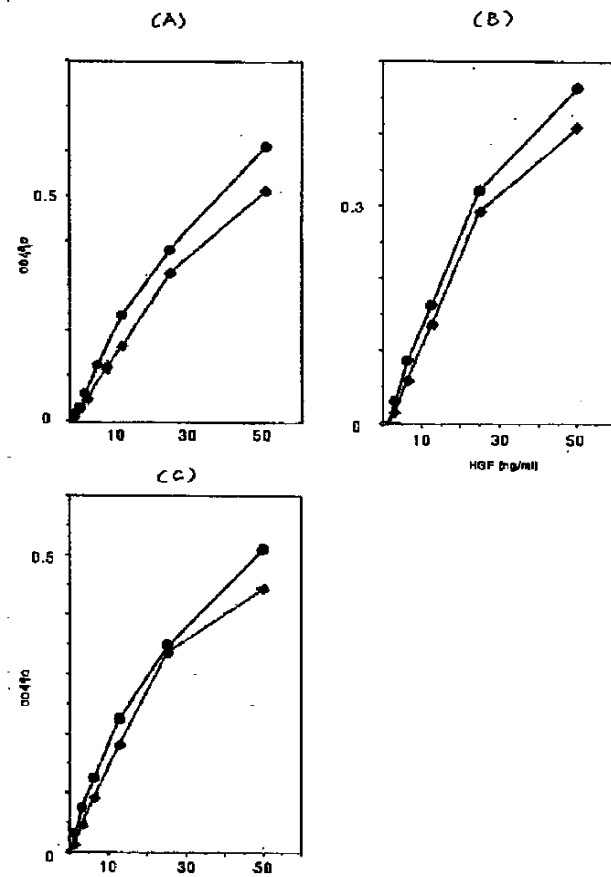


写真

【図4】



【図5】



【手続補正書】

【提出日】平成6年11月2日

【手続補正1】

【補正対象書類名】図面

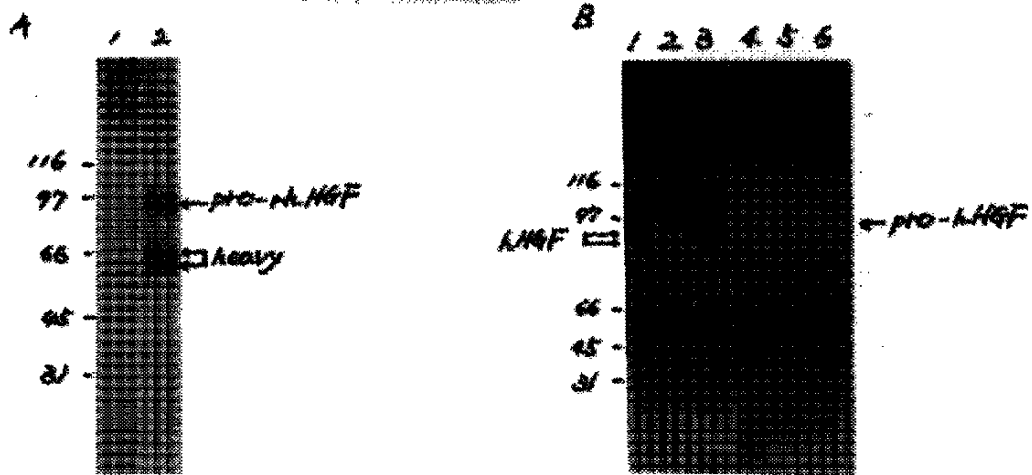
【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】

図面代用写真



**PAT-NO:** JP408035968A  
**DOCUMENT-IDENTIFIER:** JP 08035968 A  
**TITLE:** DIAGNOSIS METHOD FOR HEPATIC  
DISEASE  
**PUBN-DATE:** February 6, 1996

**INVENTOR-INFORMATION:**

NAME	COUNTRY
DAIKUHARA, YASUSHI	
ARAGAKI, NAOTOSHI	
ISHII, TAKEHISA	
SATO, MASANORI	

**ASSIGNEE-INFORMATION:**

NAME	COUNTRY
MITSUBISHI CHEM CORP	N/A

**APPL-NO:** JP06192105  
**APPL-DATE:** July 22, 1994

**INT-CL (IPC):** G01N033/576 , A61K039/395 ,  
G01N033/53

**ABSTRACT:**

PURPOSE: To make it possible to find hepatic disease in the early period by detecting the single-stranded human hepatocyte growth factor of the inactive type in human body fluid.

CONSTITUTION: The single-stranded human hepatocyte growth factor of the inactive type (HGF) contained in human body fluid, e.g. blood, plasma, lymph, sweat, urine or the like, is detected by using antibody. The single-stranded HGF is the precursor of double-stranded HGF (active type). In this detection, any of the following methods is used: only the single-stranded HGF is specifically detected; or the total sum of the single-stranded HGF and the double-stranded HGF is detected and the double-stranded HGF is subtracted. The antibodies for the single-stranded HGF and the double-stranded HGF are used for both methods. As the antibody, any of polyclonal antibody and monoclonal antibody can be used. The antibody is marked with enzyme such as, e.g. horseradish peroxidase and provided for enzyme immunoassay. The single-stranded HGF is not present in a healthy person and presents only in patients of acute, chronic, fluminant hepatitis, cirrhosis or the like. Therefore, the hepatic disease can be found at the early period.

COPYRIGHT: (C)1996, JPO